

Universidad Pública de Navarra

Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**ESCUELA TECNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS AGRONOMOS**

***NEKAZARITZAKO INGENIARIEN
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKOA***

**DESARROLLO DE PELÍCULAS COMESTIBLES ANTIOXIDANTES BASADAS EN LA
INCORPORACIÓN DE α -TOCOFEROL**

α -TOKOFEROLEAN OINARRITUTAKO FILM JANGARRI ANTIOXIDATZAILEEN GARAPENA

presentado por

MIREN BEUNZA ARÍZTEGUI *(e)k*

aurkeztua

INNOVACIÓN EN PROCESOS Y PRODUCTOS ALIMENTARIOS
GRADUA ELIKAGAI PROZESU ETA PRODUKTUEN BERRIKUNTZAN

Junio, 2016 / 2016, *ekaina*

RESUMEN

El objetivo del presente Trabajo Fin de Grado fue el desarrollo de películas comestibles (PC) antioxidantes como herramientas para controlar la oxidación lipídica en alimentos ricos en ácidos grasos poliinsaturados. Para ello se elaboraron y caracterizaron soluciones formadoras de películas (SFP) y PC basadas en proteína aislada de suero lácteo (WPI) a la que se incorporó α -tocoferol a concentraciones de 0,5% y 1% como agente antioxidante.

Fue necesario realizar un estudio previo con disoluciones de α -tocoferol en etanol. Estas disoluciones resultaron tener una elevada actividad antioxidante y resistencia a temperaturas de hasta 40 °C. Las SFP resultaron tener un tamaño de partícula de entre 0,2 y 0,3 μm fueron estables y mostraron una alta actividad antioxidante. La adición de α -tocoferol a SFP no afectó significativamente al pH ni a la densidad, pero sí a la tensión superficial la cual disminuye con el aumento de la concentración del α -tocoferol.

Por su parte, las PC fueron uniformes, continuas, flexibles, y no presentaron poros o fracturas y presentaron grosor de entre 100 y 120 μm . Se observó que con el aumento de α -tocoferol la humedad de las PC incrementó y disminuyó la luminosidad. La velocidad de extracción y la actividad antioxidante del α -tocoferol de las películas comestibles en solventes etanólicos es mayor en películas de 1% de concentración que en las de 0,5%. Además, tanto la velocidad de extracción como la actividad antioxidante aumentan con la proporción etanol:agua. Los recubrimientos comestibles con α -tocoferol podrían ser utilizados para extender la vida útil de los alimentos y protegerlos de la oxidación lipídica.

Palabras clave: α -tocoferol, SFP, películas comestibles, actividad antioxidante, extracción, vida útil, oxidación lipídica.

ABSTRACT

The aim of this Project was the development of antioxidant edible films (EF) as a tool to control lipid oxidation of polyunsaturated fatty acids. To this end, film forming solutions (FFS) and edible films with 0,5% and 1% of α -tocopherol concentrations based on whey protein isolate (WPI) were made and characterised.

A previous study of α -tocopherol in ethanol solutions was necessary. The α -tocopherol solution in ethanol reached high antioxidant activity and it resisted temperatures up to 40 °C. FFS with particle size between 0,2 and 0,3 μm were stable and showed high antioxidant activity. The addition of α -tocopherol to FFS did not affect significantly neither pH nor density, but it did surface tension (higher α -tocopherol concentration increased surface tension).

EF were found to be uniform, continuous and flexible, without pores or cracks and had a thickness between 100 and 200 μm . It was observed the water content of edible films increased and luminosity decreased with higher of α -tocopherol concentration. Extraction velocity and antioxidant activity of α -tocopherol from edible films to ethanol solvent and its antioxidant activity were higher in films with 1% concentration than in films with 0,5% films. Besides, extraction velocity and antioxidant activity increased with the ethanol:water ratio. We consider that EF with α -tocopherol may be used to protect food from lipid oxidation and to extend their shelf life

KEY WORDS: α -tocopherol, FFS, edible films, antioxidant activity, extraction, shelf life, lipid oxidation.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Recubrimientos comestibles	1
1.1.1 Clasificación recubrimientos comestibles	1
1.2 Recubrimientos comestibles activos	3
2. OBJETIVOS	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS	7
3.1 Materiales	7
3.2 Métodos	8
3.2.1 Pruebas preliminares: desarrollo y caracterización de emulsiones y soluciones alcohólicas de α -tocoferol	8
- Formación y estabilidad de emulsiones	8
- Formación y caracterización de α -tocoferol en soluciones alcohólicas.....	9
▪ Adición de α -tocoferol a soluciones alcohólicas	9
▪ Detección y cuantificación de α -tocoferol a través de espectrofotometría.....	9
▪ Actividad antioxidante de α -tocoferol en soluciones alcohólicas	9
▪ Termolabilidad de α -tocoferol en soluciones alcohólicas	11
3.2.2 Desarrollo y caracterización de soluciones formadoras de películas (SFP) comestibles con α -tocoferol	11
- Formación y caracterización de SFP	11
3.2.3 Desarrollo y caracterización de soluciones formadoras de películas (SFP) comestibles con α -tocoferol	14
- Formación y caracterización de películas.....	14
3.2.4 Métodos de análisis estadísticos	16

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
4.1 Pruebas preliminares: desarrollo y caracterización de emulsiones y soluciones alcohólicas de α -tocoferol.....	18
- Estabilidad de emulsiones	18
- Detección y cuantificación de α -tocoferol a través de espectrofotometría	20
- Actividad antioxidante y termolabilidad de α -tocoferol	21
4.2 Desarrollo y caracterización de películas comestibles basadas en WPI con α -tocoferol	24
- Soluciones formadoras de películas (SFP) comestibles	24
- Películas comestibles antioxidantes: caracterización tecnológica, microestructura y actividad antioxidante	26
- Análisis de la migración del α -tocoferol de las películas comestibles de WPI hacia diferentes disoluciones alcohólicas	28
5. CONCLUSIONES.....	32
6. BIBLIOGRAFÍA	33

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Recubrimientos comestibles

Un recubrimiento comestible es una capa fina de material comestible que puede actuar como sistema dosificador de agentes activos que se adiciona a un producto formando una superficie alimentaria homogénea (Otín, 2011); (Skurtys *et al.*, 2010). Los recubrimientos comestibles pueden usarse como vehículo natural o químico de agentes antimicrobianos, antioxidantes, enzimas o ingredientes funcionales como probióticos, minerales y vitaminas (Skurtys *et al.*, 2010).

Hoy en día es en frutas y verduras donde más comúnmente se aplican los recubrimientos comestibles, pero también se usa en el sector pastelero, en bollería, repostería y confitería. Según el artículo de Galus y Kadzińska (2015), los recubrimientos y películas comestibles también se utilizan en el mercado en productos frescos y procesados, en quesos, carne y salchichas.

La finalidad de los recubrimientos comestibles está normalmente relacionada con la prevención de la oxidación lipídica, la acción antimicrobiana, la barrera frente a los agentes externos como por ejemplo el oxígeno, la migración de humedad, etc., conservar las características sensoriales del propio producto para retener los componentes, conferir integridad estructural, atribuir comodidad y alargar la vida útil de los productos (Galus y Kadzińska, 2015).

1.1.1. Clasificación películas comestibles

Los recubrimientos comestibles se clasifican en 3 categorías según la naturaleza de sus componentes: hidrocoloides (contienen proteínas, polisacáridos o alginatos), lípidos (se constituyen de ácidos grasos, acilglicérols o ceras) y películas comestibles compuestos (sintetizados mediante la combinación de las dos categorías). Además de los componentes necesarios para la obtención de películas comestibles, se pueden añadir otros agentes que proporcionen una funcionalidad como por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, etc.

Los hidrocoloides son polímeros hidrófilos, y en general contienen muchos grupos hidroxilo. Varios ejemplos son el alginato, goma arábiga, pectina y goma xantana.

Hoy en día su uso está muy extendido para la formación de películas comestibles para controlar la textura, el flavor, y la vida útil de los alimentos.

Todos los hidrocoloides utilizados para la formación de películas comestibles son totalmente o parcialmente solubles en agua y son principalmente utilizados para aumentar la viscosidad de la fase continua (acuosa). También son emulsionantes y estabilizantes de la emulsión, puesto que se reducen la unión de las gotas de agua y por lo tanto se disminuye la floculación y la coalescencia en el película comestible.

Los hidrocoloides pueden ser sintetizados mediante polisacáridos, proteínas y azúcares. Los polisacáridos utilizados pueden ser el agar (E406), alginato (E400-E404), carragenato (E407), derivados de la celulosa, quitosano, gomas, pectina o almidón. Respecto a las proteínas, son comúnmente utilizadas la gelatina y proteínas de suero lácteo.

Este Trabajo Fin de Grado ha utilizado como matriz formadora de recubrimiento, la proteína aislada de suero lácteo (Whey Protein Isolate-WPI). La WPI produce recubrimientos totalmente solubles en agua excepto cuando la proteína es desnaturalizada y se producen recubrimientos insolubles. El WPI contiene más de un 90% de proteína, la cual la constituyen una serie de proteínas: lactoalbúminas (α -La), β -lactoglobulinas (β -Lg), seroalbúmina bovina (BSA), inmunoglobulinas (Igs), y proteasas y peptonas (PP). Por otro lado, las películas basadas en proteína presentan una buena barrera contra los gases, poca permeabilidad al oxígeno, y bastante pobre contra la humedad. La WPI actúa cuando es añadida a películas comestibles como emulsionante, como agente gelificante y agente espumante (Osés J., 2006).

Las películas comestibles basados en proteína creados sin la adición de ningún plastificante son muy frágiles, por ello la adición de plastificantes aporta flexibilidad, elasticidad y resistencia a las películas comestibles. Además, los plastificantes tienen bajo peso molecular, y son normalmente añadidos a películas comestibles hidrocoloides para la formación de soluciones más flexibles. En general, se requieren plastificantes en las películas comestibles basados en proteínas o polisacáridos y la cantidad adicionada varía normalmente entre el 10 y el 60%.

Los plastificantes más comúnmente usados son los polioles (glicol propileno, glicerol, sorbitol, glicol polietileno, oligosacáridos). Sin embargo, la adición de plastificantes puede causar cambios significativos en las propiedades de barrera de las películas comestibles como por ejemplo el incremento de la permeabilidad de gases de las películas comestibles (o compuestos aromáticos), decremento de la capacidad de atracción de agua o el decremento de la resistencia de tracción.

Es muy común la utilización de recubrimientos comestibles en forma de emulsiones. Una emulsión es un sistema constituido por dos fases líquidas inmiscibles: fase dispersa o discontinua, y fase dispersante o continua. Las emulsiones tienen la mínima estabilidad termodinámica y las fases tienden a separarse. Lo principal razón que fuerza la separación de las fases es la tensión interfacial.

Los surfactantes activos se concentran entre las dos fases, y su adición imparte un grado de estabilidad a estos sistemas mediante la reducción de la tensión superficial. Además, la reducción de la tensión superficial ayuda a la formación de emulsiones y previene la inmediata coalescencia. Muchos estudios han sido publicados sobre la caracterización de los emulsionantes y sus funciones. Hay estudios centrados en surfactantes solubles en aceites como

son los esteres de ácidos grasos (Span). Por otro lado, para emulsionantes solubles en agua, son comúnmente usadas las macromoléculas (proteínas) que tienen la habilidad de estabilizar las emulsiones (Opawale y Burgess, 1998); (Osés J., 2006).

1.2. Recubrimientos comestibles activos

La nueva generación de recubrimientos comestibles y películas comestibles están siendo especialmente diseñados para obtener el incremento en su funcionalidad incorporando agentes antimicrobianos, antioxidantes, enzimas o ingredientes funcionales como por ejemplo los probióticos, minerales y vitaminas. Los recubrimientos comestibles proporcionan una protección adicional a los productos frescos, e incluso proporciona el efecto de una atmósfera modificada, modificando la composición del gas interno del producto (Anam-Dong, Sungbuk-Ku, Seoul, 1999).

En general, a los recubrimientos y películas comestibles se les añaden lípidos para reducir la transferencia de vapor de agua por su carácter hidrófobo. Además la incorporación de antioxidantes en películas comestibles y recubrimientos comestibles proporciona un aumento de la vida útil del producto protegiéndolo contra el enranciamiento oxidativo, la degradación y la decoloración, puesto que estos son las principales causas que afectan a la calidad de los alimentos (Fabra, Hambleton, Talens, Debeaufort, y Chiralt, 2011). Los antioxidantes naturales como por ejemplo los compuestos fenólicos, la vitamina E y C de origen sintético, son muy utilizados en películas comestibles (Skurtys O *et al.*, 2010).

Es común la adición de agentes antioxidantes en la formulación de películas y recubrimientos comestibles para obtener una liberación continua del agente a una velocidad que permita obtener el beneficio buscado. Estos compuestos son añadidos para que los recubrimientos comestibles tengan propiedades antimicrobianas, antioxidantes, de protección frente a las condiciones externas al producto...

Los aditivos permitidos para su uso en recubrimientos comestibles son los citados en el Real Decreto 142/2002 Anexo I, III IV y V del 1 de febrero, y más específicamente, los antioxidantes permitidos se describen en el Anexo III del mismo.

En este Trabajo se aplicará a las películas comestibles el compuesto antioxidante α -tocoferol, del que se tratará más adelante y el cual previene la oxidación lipídica y el enranciamiento de los ácidos grasos poliinsaturados.

La vitamina E es un término de antioxidantes potentes y liposolubles. La actividad de la vitamina viene dada por 4 tocoferoles (a, b, g, d) y 4 tocotrienoles (a, b, g, d).

La actividad antioxidante de la vitamina E ha llevado a la realización de estudios de enfermedades crónicas, y especialmente las cardiovasculares, la arterosclerosis y el cáncer.

Además, estudios epidemiológicos demuestran que el alto contenido de vitamina E en la dieta está relacionado con la disminución de enfermedades cardiovasculares, a diferencia de otros antioxidantes de la dieta como por ejemplo la vitamina C y el β -caroteno. Esto justifica que la vitamina E tiene una función específica como antioxidante (Brigelius-Flohé y Traber, 1999).

La vitamina E es un compuesto liposoluble que como todas las demás vitaminas, debe obtenerse de la dieta puesto que estos compuestos no pueden ser sintetizados por el organismo humano. Esta vitamina agrupa tocoferoles y tocotrienoles, de los cuales α -tocoferol es la más abundante forma en la naturaleza y tiene el que más actividad biológica (Brigelius-Flohe y Traber, 1999).

Su actividad fisiológica primaria en los animales parece ser la de antioxidante, indicándose que esta vitamina es el principal compuesto eliminador de radicales libres.

En la Figura 1 se muestran las formas naturales de la vitamina E.

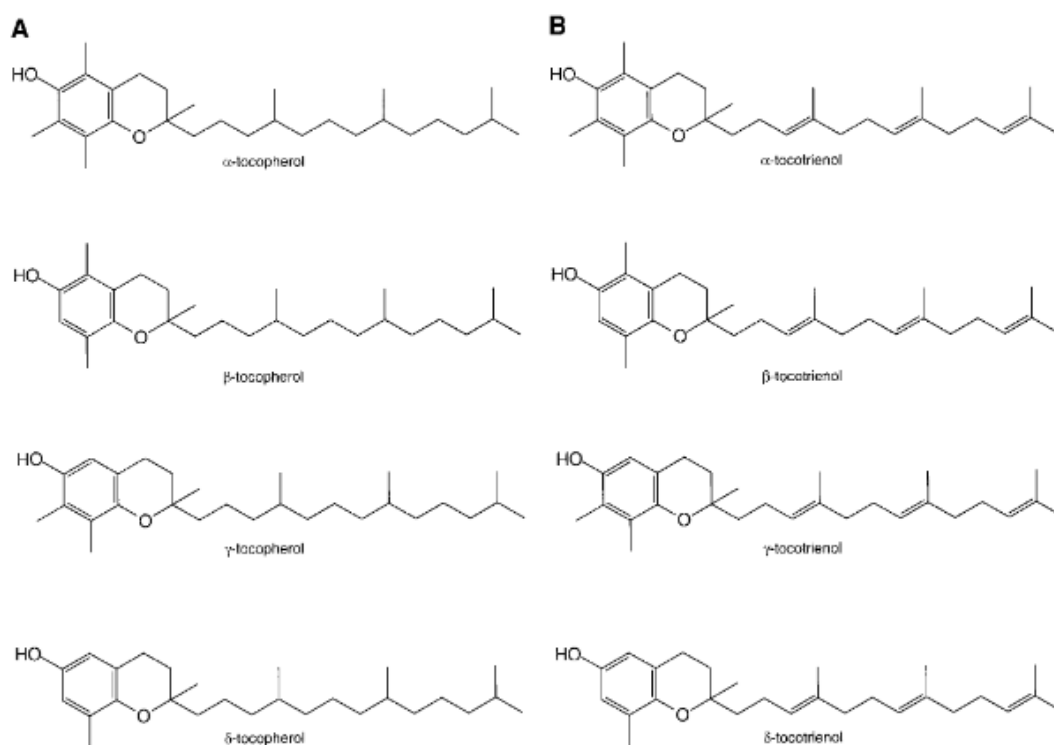


Fig. 1: Formas naturales de tocoferol (Brigelius-Flohe y Traber, 1999)

α -Tocoferol

Este Trabajo Fin de Grado se centra en α -tocoferol, la más abundante forma de la vitamina E el cual está permitido usar según el Real Decreto 142/2002 de 1 de febrero en los siguientes productos:

- Aceites y grasas de origen animal o vegetal sin emulsionar (excepto aceites vírgenes y aceites de oliva)

- Aceites y grasas sin emulsionar de origen animal o vegetal (excepto aceites vírgenes y aceites de oliva) destinados específicamente a cocciones y/o frituras o a la preparación de salsas.
- Aceite de oliva refinado incluido el aceite de orujo de aceituna.

Está permitido el uso de α -tocoferol en alimentos como se ha mencionado anteriormente y en el etiquetado debe aparecer como aditivo E-307. El α -tocoferol se define como aditivo según el Real Decreto 866/2008 de 23 de mayo. Según este Real Decreto, un aditivo es “toda sustancia incorporada a los polímeros durante los procesos de síntesis, elaboración o transformación, con el fin de facilitar dichos procesos y/o modificar convenientemente las propiedades finales del producto acabado. Estos aditivos, con excepción de los colorantes, deberán figurar en las correspondientes listas positivas”.

El α -tocoferol es un compuesto de carácter muy hidrófobo, y dada su capacidad antioxidante es en los compuestos lipídicos como en las grasas donde actúa para prevenir o retardar la rancidez oxidativa, pudiendo alargar la vida útil de productos susceptibles a la oxidación. Cuando es incorporado a películas comestibles, puede estabilizar diferentes componentes alimentarios por ejemplo en lípidos, y mantener el color del alimento original mediante la prevención de la oxidación enzimática común en frutas y hortalizas desencadenadas por la enzima polifenoloxidasas (PPO), (Olivas, González-Aguilar, Martín-Belloso y Soliva-Fortuny, 2012).

Además, al calentar el α -tocoferol la estabilidad es mayor que la de otros antioxidantes naturales o sintéticos, no son volátiles (como el Butilhidroxianisol, BHA, y Butilhidroxitolueno, BHT) y no alteran el flavor.

Por otro lado, este compuesto antioxidante es muy sensible a la luz, al calor y al oxígeno, y su manipulación requiere trabajar con sumo cuidado.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal que se quiere alcanzar es estudiar el efecto de la presencia de α -tocoferol en las propiedades antioxidantes de soluciones formadoras de películas y en las propias películas comestibles basadas en WPI. Para ello, se establecieron una serie de objetivos específicos:

Objetivo específico 1: Caracterizar las soluciones formadoras de películas basadas en WPI realizadas con diferentes concentraciones de α -tocoferol.

Objetivo específico 2: Analizar las propiedades de películas comestibles basadas en WPI con diferentes concentraciones de α -tocoferol.

3.1 MATERIALES

Para la realización de los diferentes experimentos se empleará los siguientes materiales:

- α -Tocoferol $\geq 95.5\%$ como agente antioxidante (SIGMA-ALDRICH, EEUU)
- Sorbitan monooleato (Span 80) como emulsionante (Merck, Alemania)
- Glicerol (Panreac, Barcelona, España)
- Proteína de suero aislada (WPI), fue proporcionado por Davisco Food International (Le Sueur, MN, EEUU).
- 2,2-difenil-1-picril-hidroxilo (DPPH^{•+}) proporcionado por SIGMA-ALDRICH (EEUU)
- Etanol absoluto de Productos OPPAC S.A. (Noain, España)
- Etanol 96,6° de Productos OPPAC S.A. (Noain, España)
- Metanol de Productos OPPAC S.A. (Noain, España)

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Pruebas preliminares: desarrollo y caracterización de emulsiones y soluciones alcohólicas de α -tocoferol

Formación y estabilidad de emulsiones

Se elaboraron emulsiones de 100 mL siguiendo los siguientes pasos:

a. Elaboración de emulsiones

1. Se pesaron de los compuestos para cada formulación con las proporciones mostradas en la Tabla 1.
2. A continuación, mediante Ultra-turrax T25 IKA Werke (Alemania) durante 4 min a 13.000 rpm y ultrasonidos Hielscher UP400S (Alemania) durante 4 min a máxima amplitud se lleva a cabo la dispersión de partículas de α -tocoferol.
3. Se centrifugan las muestras mediante la centrífuga P Selecta, Barcelona (España) a condiciones de 3.500 rpm durante 10 min.
4. Se conservan las emulsiones en tubos de ensayo a temperatura ambiente y en refrigeración durante 72 h.

Tabla 1: Proporciones de cada componente para la realización de emulsiones

Formulación/compuesto		Agua % (p/p)	α -tocoferol % (p/p)	Span 80 (g)	WPI (%p/p)
tocoferol:agua	1%	99	1	-	-
	0,50%	99,5	0,5	-	-
tocoferol:agua:Span 80	1%	99	1	0,1	-
	0,50%	99,5	0,5	0,1	-
tocoferol:agua:WPI	Control	90	-	-	10
	1%	89	1	-	10
	0,50%	89,5	0,5	-	10

b. Caracterización de emulsiones

Se evalúa la estabilidad de las emulsiones mediante la cantidad de cremado observado después de centrifugar las muestras. Cuanto menos cremado más estable será la emulsión.

La estabilidad de cada una de las emulsiones determinó la elección de los materiales necesarios para la realización de recubrimientos comestibles.

Formación y caracterización de α -tocoferol en soluciones alcohólicas

Adición de α -tocoferol a soluciones alcohólicas

La adición de α -tocoferol a etanol y su medición ayudarán a comprender su comportamiento sin haber sufrido ningún proceso de oxidación o estrés mecánico. Para la realización de las disoluciones se ha apoyado en el siguiente protocolo:

1. Se pesa el α -tocoferol: 0,01 g 0,05 g 0,1 g 0,5 g y 1 g en cada matraz aforado de 100 mL.
2. Se enrasa hasta los 100 mL con etanol 96,6°.
3. Se agita manualmente hasta que el α -tocoferol quede totalmente disuelto.

Detección y cuantificación de α -tocoferol a través de espectrofotometría

En primer lugar se deberá de determinar la longitud de onda en el que medir las absorbancias de α -tocoferol en etanol, seguido de la realización de una recta de calibrado para hallar las concentraciones.

Se halló la longitud de onda óptima para la toma de datos de soluciones de α -tocoferol en etanol a través de la realización de un barrido de longitudes de onda con el espectrofotómetro Hitachi UH5300 (Japón). También se determinó el rango de densidad óptica de soluciones de α -tocoferol en etanol con la que se puede trabajar. Después se construyó una recta patrón (3 repeticiones independientes) mediante la toma de datos de 10 concentraciones diferentes de α -tocoferol en etanol comprendidas en un rango de entre 0 y 350 ppm. De esta manera fue posible relacionar las absorbancias obtenidas de la espectrofotometría con las concentraciones extraídas a las soluciones alcohólicas.

Actividad antioxidante de α -tocoferol en soluciones alcohólicas

La actividad antioxidante se determina mediante el método descrito por Brand Williams, Cuvelier y Berset (1994) donde se establece que la disolución de DPPH^{•+} debe ser de 60 μ M de concentración. En este caso esta disolución se realiza mediante la adición de 0,0023 g de compuesto DPPH^{•+} a 100 mL de metanol. Se homogeneiza correctamente hasta que la disolución quede uniforme y se protege de la luz y del oxígeno para evitar su degradación. Para determinar la actividad antioxidante de una muestra con α -tocoferol se le añade 60 μ L de la muestra con α -tocoferol a 2.940 μ L de disolución DPPH^{•+} a 515 nm de longitud de onda en el espectrofotómetro.

Se realizan diferentes estudios preliminares para el estudio de la actividad antioxidante:

1. Se quiere determinar el tiempo de reacción del α -tocoferol en contacto con la disolución DPPH^{•+} mediante 4 concentraciones diferentes de α -tocoferol en etanol: 0,01%, 0,05%, 0,1% y 1%. Se escogió este rango de concentraciones de α -tocoferol puesto que se quiso conocer el tiempo de reacción de la solución DPPH^{•+} con la muestra de α -tocoferol en la solución alcohólica obtenida de la extracción de la puesta en contacto de las películas comestibles y etanol.
2. Por otra parte, se quiere relacionar la caída de las absorbancias de las diluciones de α -tocoferol en etanol con la concentración de α -tocoferol en la muestra. Siguiendo el método de Otín (2013), se añade la muestra con α -tocoferol a la solución DPPH^{•+} y se realiza una cinética de absorbancias respecto al tiempo durante 30 min.
3. Para determinar la actividad antioxidante del α -tocoferol en soluciones alcohólicas a diferentes concentraciones, se realizan las medidas de absorbancias al principio y al final de la reacción mediante el espectrofotómetro (Fig. 4 B).

La actividad antioxidante no puede ser medida directamente, pero puede determinarse por los efectos del compuesto antioxidante en un proceso de oxidación controlado (Tovar del Río, 2013). Para la medida de actividad antioxidante se utiliza el método comúnmente usado del radical libre de DPPH^{•+} (2,2-difenil-1- picril-hidroxilo) el cual fue propuesto por Blois (1958). Este método se atribuye a la deslocalización del electrón desapareado, esta deslocalización también le otorga una coloración violeta caracterizada por una banda de absorción, en solución metanólica, centrada alrededor de 515 nm. Es decir, el método de DPPH^{•+} está basado en la transferencia de electrones.

Se debe tener en cuenta que para obtener resultados se debe relacionar la absorbancia mediante la fórmula de porcentaje de inhibición (1).

$$(1) \quad \% \text{ Inhibición} = \frac{Abs_{t=0} - Abs_{t=4 \text{ min}}}{Abs_{t=0}}$$

Cuando una disolución de DPPH^{•+} entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno se forma la forma reducida del DPPH^{•+} y se produce una pérdida de color de la disolución, desvaneciéndose el color violeta y por lo tanto, una pérdida de la absorbancia. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes (Muñoz Juárez y Dra. Gutiérrez, 2008) (Tovar del Río, 2013).

Termolabilidad de α -tocoferol en soluciones alcohólicas

Se estableció un protocolo para la determinación de la resistencia térmica del α -tocoferol. Las pruebas de termolabilidad se realizaron con la disolución α -tocoferol:etanol 96,6° a una concentración de 350 ppm.

1. En primer lugar se procede al pesado de 0,1 g de α -tocoferol y se enrasa hasta 100 mL de etanol (96,6°) en un matraz aforado.
2. Se realizan dos diluciones: 1:1 seguida de 7:3 muestra con α -tocoferol: etanol 96,6°. De esta forma se obtiene una solución de 350 ppm de concentración.
3. Se llenan 12 viales (4 temperaturas con 3 repeticiones) con 4 ml de la disolución
4. Se llevan al baño modelo P Selecta Medifriger BL-S, (Barcelona, España) con una temperatura de 40, 70 y 90°C (Fig. 2).
5. Se mide la concentración a 295 nm de longitud de onda y la actividad antioxidante a 515 nm mediante el espectrofotómetro a los 0-15-45 y 60 min siguiendo el método descrito en el anterior apartado.

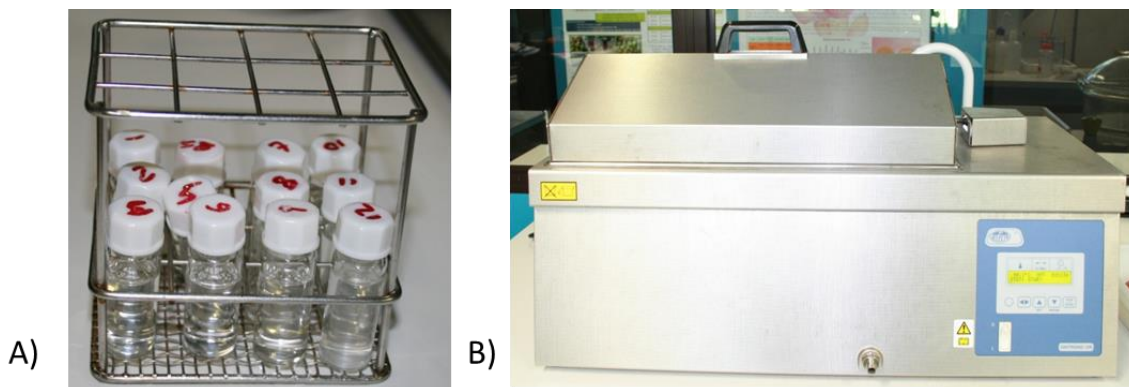


Fig. 2: Material para realizar la prueba de termolabilidad. A) 12 viales con muestra de α -tocoferol en etanol 96,6°. B) Baño a 40, 70 o 90 °C.

3.2.2 Desarrollo y caracterización de soluciones formadoras de películas (SFP) comestibles con α -tocoferol

Formación y caracterización de SFP

Las SFP se realizaron de acuerdo con el método descrito por Otín (2013),

a. Elaboración de SFP

1. En primer lugar, se preparó una formulación base (FB) común para todas las formulaciones con agua, glicerol y WPI con la formulación agua: α -tocoferol:WPI (Tabla 2).

2. Se mantuvieron en agitación (Stirrer Velp Scientifica, Italy) mediante agitadores (Fig. 3 A) hasta que la solución quedara homogénea.

3. Las soluciones se introducen a un baño a 90 °C durante 30 min (Fig. 3 B) con un movimiento a 33 rpm. Este proceso tiene como fin la desnaturalización proteica del WPI para que actúe como emulsionante de las soluciones formadoras de películas.

4. A continuación, se enfrían las muestras en un baño con hielo.

5. Se añade el α -tocoferol correspondiente a cada formulación (Fig. 3 C).

6. Y por último se homogeneiza la muestra mecánicamente mediante Ultra-turrax durante 4 min a 13.000 rpm (Fig. 3 D) y ultrasonidos a máxima amplitud durante 4 min (Fig. 3 E) tal y como se describe en el método descrito.

Tabla 2: Proporciones de cada componente para la realización de películas comestibles

		Agua % (p/p)	α -tocoferol % (p/p)	Glicerol % (p/p)	WPI % (p/p)
SFP	Control	85	-	5	10
	1%	84	1	5	10
	0,50%	84,5	0,5	5	10

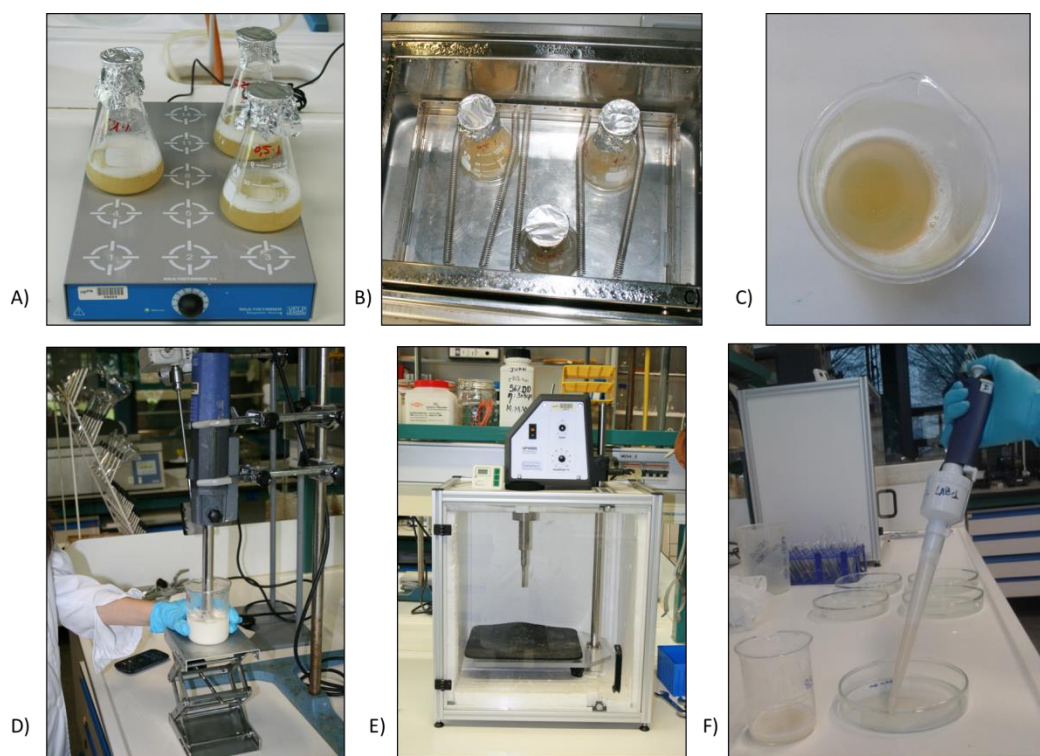


Fig. 3: Formación de SFP y de películas. A) Disolución de los componentes de la formulación base. B) Desnaturalización de la proteína WPI en baño. C) FB con la adición de α -tocoferol. D) Homogeneización mecánica mediante Ultra-turrax. E) Homogeneización mediante ultrasonidos. F) Dispersión de las Soluciones formadoras de películas (SFP) en placas petri.

b. Caracterización de SFP

Las SFP (Fig. 4 A) se caracterizaron de acuerdo con las siguientes determinaciones:

1. La actividad antioxidante de las películas basadas en WPI con α -tocoferol fue medida mediante el uso del radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH^{•+}) diluido en metanol tal y como se describe en el apartado “actividad antioxidante” (página 2). El valor se refleja como porcentaje de inhibición.
2. La tensión superficial se obtiene mediante el método descrito por --- del anillo de Du Nouy, con ayuda de un Tensiómetro digital K9 (Krüss, Alemania) (Fig. 4 C). Se requiere un espacio estable y libre de movimiento para que las medidas sean fiables y el anillo penetre en la solución al mismo tiempo alrededor de todo el borde del aro. Este anillo de platino se sumerge en líquido, y el equipo devuelve el valor de máxima fuerza requerida para atravesar el líquido desde el interior hacia la superficie. Se realizó una toma de datos con 3 repeticiones por formulación.
3. pH: Se realiza la caracterización de los FFS también mediante la medida del pH con ayuda del pH-metro Basic20 (Crison, Barcelona, España) (Fig. 4 D). Después de su calibración se sumerge la sonda en la muestra y el equipo devuelve el valor de pH. Entre muestra y muestra se realiza una limpieza con agua destilada.
4. La densidad se obtuvo mediante el densímetro Proton 1.000-1.100 kg/m³ (Fig. 4 E). El densímetro se sumerge en la solución y el valor será el que asoma entre la solución y el ambiente.
5. Para obtener la Potencial- ζ y el tamaño de partícula se recoge muestras de las emulsiones en tubos de ensayo y se envía a analizar a una empresa externa.

A través del Potencial- ζ de cada emulsión de α -tocoferol se determinó la movilidad electroforética de las partículas en un equipo Zetasizer (Nano-Z, Malvern Instruments, Reino Unido).

El tamaño de partícula se determina usando un difractómetro láser Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Reino Unido).

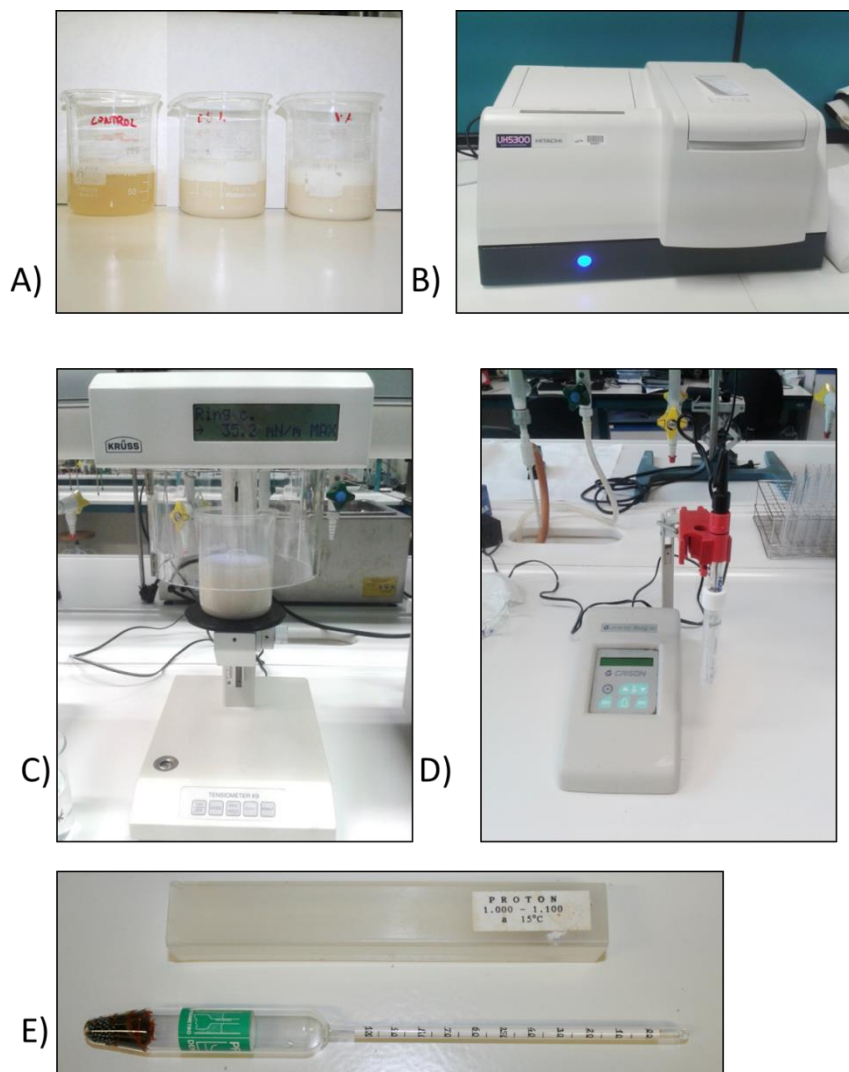


Fig. 4: Caracterización de soluciones formadoras de películas. A) Soluciones formadoras de películas control, 0,5% α -tocoferol y 1% α -tocoferol. B) Espectrofotómetro. C) Caracterización de tensión superficial. D) pH-metro. E) Densímetro

3.2.3 Desarrollo y caracterización de películas comestibles basadas en WPI con α -tocoferol

Formación y caracterización de películas

Se trabaja con la metodología descrita para las SFP de α -tocoferol con variaciones en la concentración del compuesto antioxidante. Se sigue la metodología de las SFP:

a. Elaboración de películas

Para la realización de películas se dispersaron 14 mL de la solución en cada placa Petri (Fig. 3 F) y se trasladaron a la cámara climática para someterse a un proceso de secado a condiciones de 25 % HR y 40 °C durante 18-20 horas, donde la cámara climática (Weiss) requiere entre 2 y 3 horas ajustarse a las condiciones establecidas.

b. Caracterización tecnológica, microestructura y actividad antioxidante

1. El espesor de las películas se determinó tomando medidas en 10 puntos elegidos al azar (Fig. 5 A) sobre toda la superficie de la película con un micrómetro digital de 1 μm de precisión (Mitutoyo Corp., Code No. 543-551-1, Model ID-F125, Japón) (Fig. 5 B).

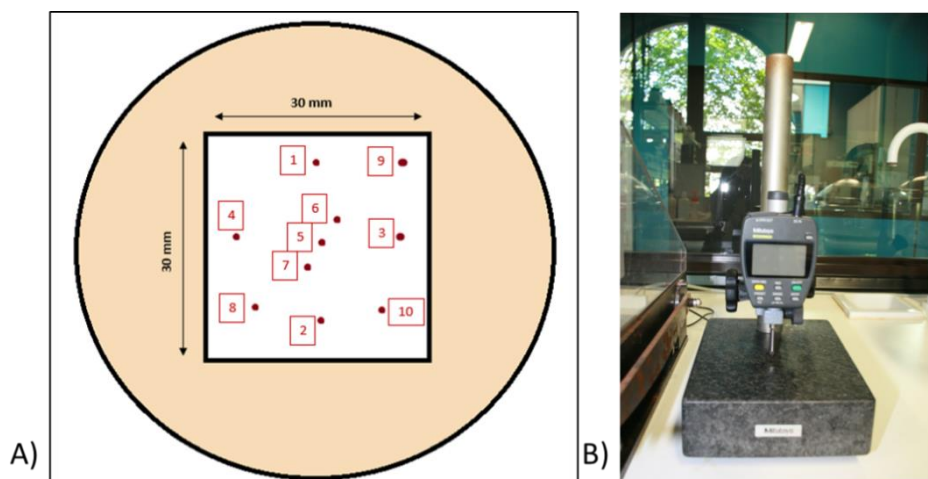


Fig. 5: Toma de datos de espesor de las películas de α -tocoferol. A) Puntos seleccionados para la obtención de la medida de espesor de las películas. B) Micrómetro digital

2. El contenido en humedad se determinó a partir de la diferencia de peso de las películas tras 24 h a 105 $^{\circ}\text{C}$ en una estufa (Weiss). Los resultados se expresan como porcentaje respecto al peso inicial como media y desviación estándar de 10 repeticiones.
3. El color de las películas se determinó por reflexión empleando el sistema de medida de color CIE $L^*a^*b^*$ (CIE, 1976) con un espectrofotómetro portátil Minolta CM 2500d (Minolta Camera Co., Ltd, Osaka, Japón), empleando como condiciones de medida el iluminante D65/observador 10 $^{\circ}$. Las películas se dispusieron para la medida sobre una placa estándar acromática de referencia $L^*=100$.
4. Microestructura: La estructura final alcanzada por las películas tras el secado, se verá influenciada por la organización estructural lograda por los diferentes componentes de las SFP y por su evolución durante el secado: floculación, coalescencia y cremado (Sánchez-González *et al.*, 2010). Para comprobar la influencia de estos procesos en la estructura final de la película se realizó el análisis microestructural de las secciones transversales de las películas. Los análisis se realizaron a partir de la microscopía electrónica de barrido (SEM). Se empleó el microscopio electrónico de barrido (Carl Zeiss Plus). Para ello las muestras se sometieron a un corte por criofractura y se observaron para una aceleración de 3 kV.

Análisis de la migración del α -tocoferol de las películas comestibles de WPI hacia diferentes disoluciones alcohólicas

Se escogieron 3 soluciones alcohólicas con diferentes proporciones de etanol para la extracción: etanol absoluto, 5:5 etanol:agua y 1:10 etanol:agua, y la extracción se realizó con piezas de películas a 0,5 y 1% de concentración de α -tocoferol. A continuación se describe el protocolo:

1. Se utilizó el método empleado por Otín (2013), modificado para soluciones alcohólicas. La extracción del α -tocoferol de películas comestibles comenzó mediante la puesta en contacto de una pieza de 9 cm² de película comestible con la solución alcohólica.
2. Con ayuda de una cubeta de cuarzo (medidas UV), se mide 3 ml de disolución en el espectrofotómetro a 295 nm a las 1-2-3-4 y 20 horas de extracción. El equipo nos devuelve el dato de la absorbancia, y con ayuda de la recta de calibrado y la ecuación se obtuvieron los datos de la concentración de tocoferol en el disolvente y se calculó la velocidad de extracción de α -tocoferol en la dilución alcohólica.
3. Además se quiso estudiar cómo afectaba las diferentes combinaciones de concentraciones de α -tocoferol y de la proporción de etanol:agua en la actividad antioxidante. Para ello, se midió la absorbancia a 515nm de longitud de onda a las 20 horas de extracción mediante el radical DPPH^{•+} y se tradujo en porcentaje de inhibición.

3.2.4 Métodos de análisis estadísticos

Los análisis estadísticos de los resultados se realizaron mediante el programa informático IBM SPSS Statistics 21.

Se estudió la relación entre la concentración de α -tocoferol en diluciones alcohólicas y su actividad antioxidante, así como el efecto tiempo-temperatura en soluciones de 350 ppm de concentración de α -tocoferol a 40, 70 y 90 °C.

Se estudiaron las variables de pH, densidad y tensión superficial de soluciones formadoras de películas, y de igual manera que las variables espesor, humedad y color de películas comestibles.

Por último, a través del análisis estadístico se observaron presencia o ausencia de diferencia significativa relativa a la extracción de películas de 0,5% y 1% de concentración en α -tocoferol en diferencias soluciones etanólicas.

Se aplica el análisis de varianza (ANOVA) simple con un nivel de significancia de 5% ($p < 0,05$) para evaluar el efecto causado por un factor en cada una de las propiedades de estudio y sus posibles interacciones.

Por otra parte, se realizan grupos homogéneos del factor estudiado mediante el método Duncan.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Pruebas preliminares: desarrollo y caracterización de emulsiones y soluciones alcohólicas de α -tocoferol

Estabilidad de emulsiones

Se elaboraron 3 emulsiones de diferente composición para realizar un estudio de la estabilidad de emulsiones de α -tocoferol. Asimismo, se realizan las emulsiones α -tocoferol:agua, α -tocoferol:agua:emulsionante y α -tocoferol:agua:WPI.

La dispersión de 0,5 y 1% de α -tocoferol en agua a través de la aplicación de 2 diferentes grados de homogeneización que combinan el empleo de Ultra-turrax y ultrasonidos focalizado sin adición de emulsionantes resultó imposible dada la hidrofobicidad e insolubilidad del α -tocoferol en agua. Durante el proceso de homogeneización se dispersó una parte del α -tocoferol pero gran parte del compuesto quedó fuertemente adherido a las paredes del rotor del vástago del Ultra-turrax y del sonotrodo del equipo de ultrasonidos focalizado (Fig. 6). Así, se recurrió a la adición de 0,10% de Span80 como agente emulsionante y se obtuvieron emulsiones de 0,5 y 1% de α -tocoferol en agua para las condiciones de homogeneización de 13.000 rpm/4 min con Ultra-turrax seguidas de 4 min para la máxima amplitud con ultrasonidos focalizado.

Tras la homogeneización las emulsiones presentaron un color blanquecino y no resultaron translúcidas. Para comprobar la estabilidad de las emulsiones por una parte se mantuvieron 72 horas a temperatura ambiente (entorno a 25 °C) y a 7 °C y por otra parte se realizó un ensayo acelerado basado en la centrifugación para comprobar la presencia/ausencia de cremado/separación de fases (Fig. 7).

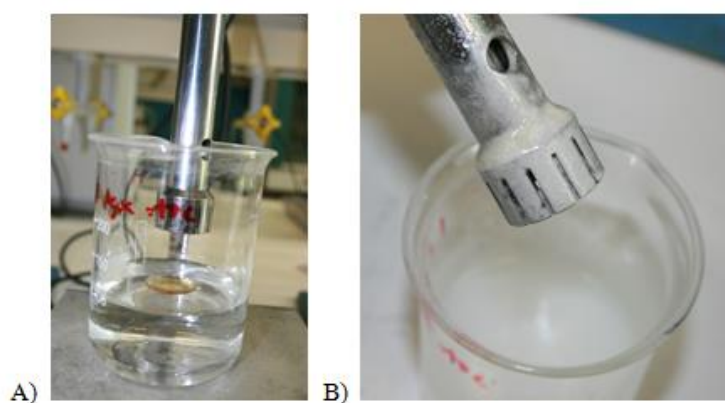


Fig. 6: Emulsión α -tocoferol:agua. A) Antes de emulsionar B) Vástago de Ultra-turrax durante la homogeneización de las fases.

Se observó que las emulsiones formadas a partir de 1% α -tocoferol eran inestables puesto que presentaron una fina capa de cremado en la parte superior, siendo más gruesa en las muestras conservadas a temperatura ambiente y la separación de fases tras el centrifugado fue evidente.



Fig. 7: Emulsión α -tocoferol:agua:emulsionante. A) Vástago Ultra-turrax después de homogeneizado. B) Emulsiones con concentración de tocoferol de 1% y 0,5% de izquierda a derecha.

Por otra parte, para el desarrollo de emulsiones estables y como alternativa al empleo de emulsionantes se recurrió al empleo de WPI (macromolécula anfifílica). De nuevo, tras la homogeneización, las emulsiones presentaron un color blanquecino y no resultaron translúcidas (Fig. 8). Tanto tras el almacenamiento a 72 °C de las emulsiones como tras su centrifugación se obtuvo una capa despreciable de cremado en la parte superior de las emulsiones. Así, se recurrió al empleo de WPI como potencial estabilizante de emulsiones acuosas de α -tocoferol y se sometieron a un estudio físico-químico de sus propiedades (ver apartado 3.2).

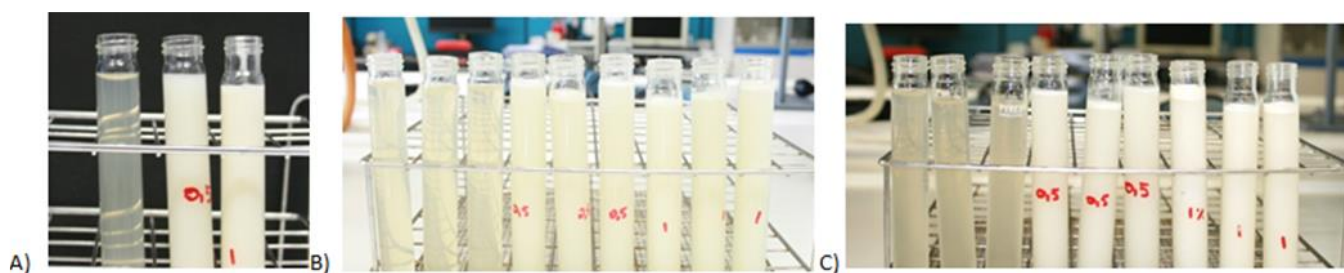


Fig. 8: Emulsiones α -tocoferol:agua:WPI. A) Tiempo 0. De izquierda a derecha: Control, 0,5% y 1 %. B) Tiempo 72 h a temperatura ambiente. 3 repeticiones por formulación. De izquierda a derecha: control, 0,5% y 1 %.. C) Tiempo 72 h en refrigeración. 3 repeticiones por formulación. De izquierda a derecha: control, 0,5% y 1 %..

Detección y cuantificación de α -tocoferol a través de espectrofotometría

Para cuantificar a través de espectrofotometría el contenido en α -tocoferol de emulsiones y soluciones alcohólicas en primer lugar se determinó el espectro de absorción del α -tocoferol así como su pico máximo de absorción. Se realizó un barrido de longitudes de onda en las zonas de UV y visible del espectro electromagnético comprendido entre 250 y 350 nm (Fig. 9) para diferentes concentraciones de α -tocoferol. De esta forma también se determinó la absorbancia máxima para el manejo de diluciones sin saturación de la señal.

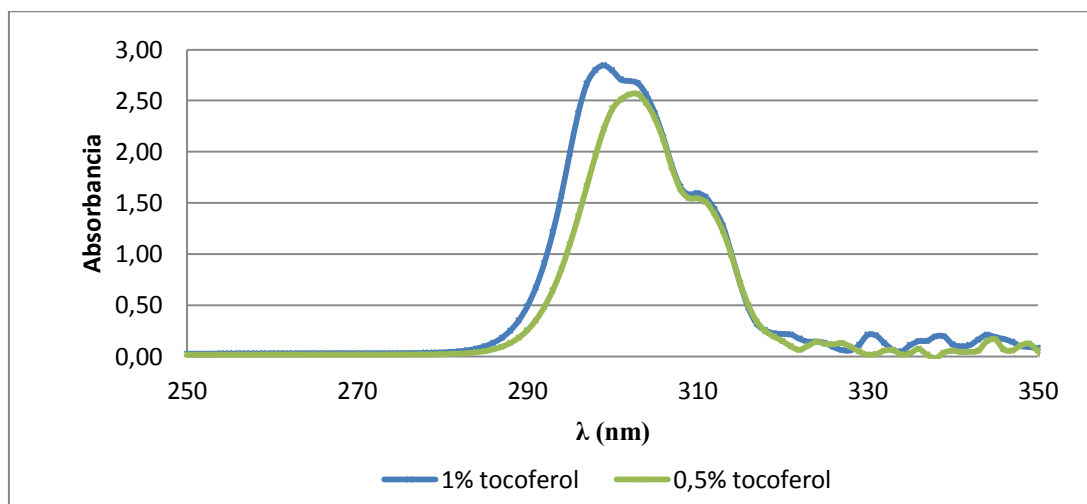


Fig. 9: Barrido de longitudes de onda de α -tocoferol en 96,6° etanol desde 250 a 350 nm.

Así, se determinó que la longitud de onda más adecuada para detectar el α -tocoferol en etanol es 295 nm y la absorbancia máxima de trabajo para evitar saturación de la señal es 2,84. Así, esta absorbancia máxima se corresponde con una concentración de α -tocoferol en etanol de 391 ppm. Fue el caso de las soluciones a 500 ppm de concentración de α -tocoferol en etanol, puesto que la concentración real y la obtenida de los resultados del espectrofotómetro no coincidieron.

Se construyó una recta patrón (3 repeticiones independientes) en etanol para el intervalo de concentraciones comprendido entre 0 y 350 ppm (Fig. 10) que relaciona la concentración de α -tocoferol con la absorbancia a través de la recta de regresión $0,0072x+0,0398$ con un coeficiente de correlación $R^2=0,9956$.

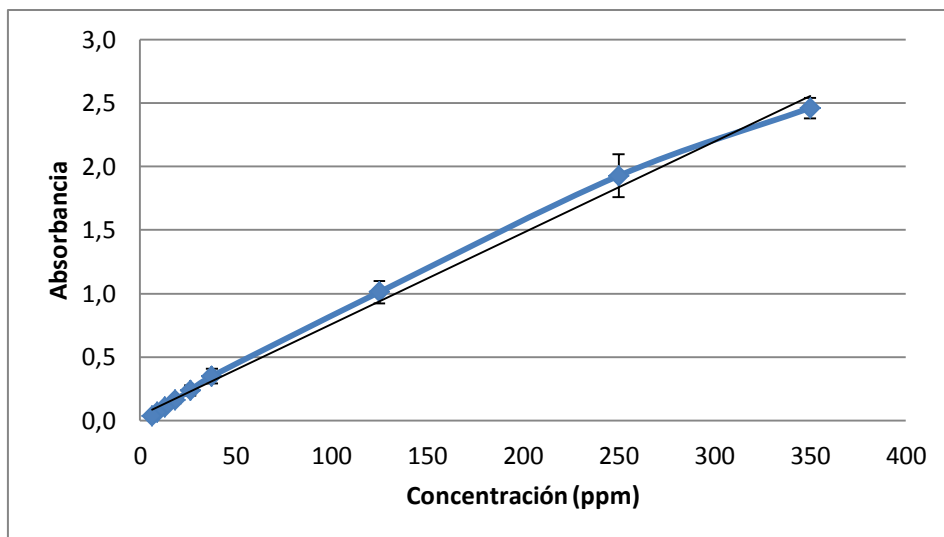


Fig. 10: Recta de calibrado α -tocoferol en alcohol 96,6°.

Actividad antioxidante y termolabilidad de α -tocoferol

Se determinó la actividad antioxidante de las diluciones alcohólicas de α -tocoferol pertenecientes a un rango de concentraciones comprendido entre 0,01 y 1%, a través de su reacción con el radical DPPH^{++} . La reacción de oxidación es muy rápida por lo que en primer lugar se ajustó el método de medida tradicional basado en la lectura a los 60 min de reacción. Se construyeron las cinéticas de la reacción y se observó que en todos los casos la lectura de absorbancia se mantenía estable a partir de los 4 minutos por lo que se fijó este tiempo como punto final de la reacción (Fig. 11 A). La velocidad de reacción y el valor de absorbancia final resultaron función de la concentración de α -tocoferol de la muestra siendo la pendiente inicial mayor cuanto mayor es la concentración de forma que el cambio de color de la solución DPPH^{++} (morado-amarillo) resultó inmediata para la concentraciones superiores a 0,5% (Fig. 11 B).

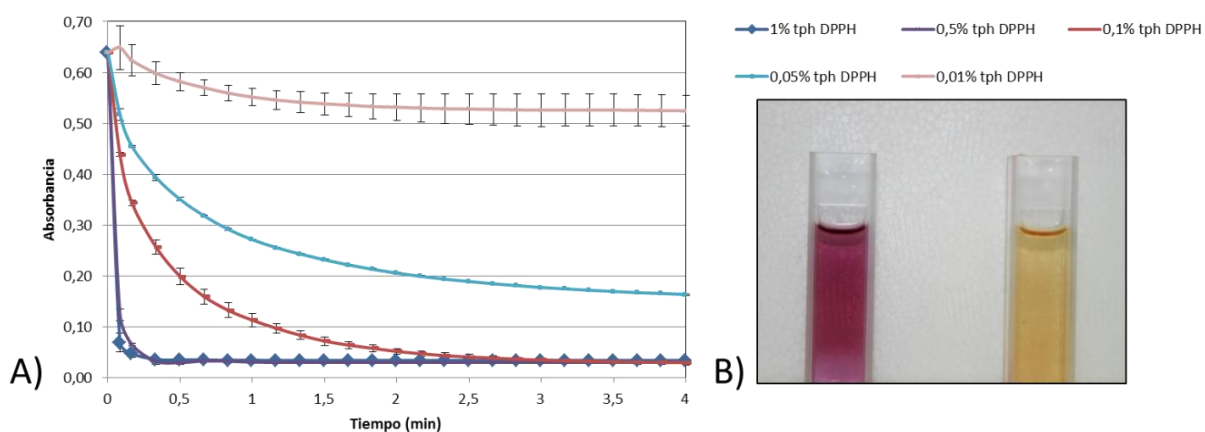


Fig. 11: Actividad antioxidante del α -tocoferol en soluciones alcohólicas. A) Cinética DPPH^{•+} y α -tocoferol para ajuste de tiempo. B) Cambio de color de la muestra de DPPH^{•+} con α -tocoferol después de 4 min de reacción

Así, se determinó la actividad antioxidante de las soluciones alcohólicas 0,01%, 0,05%, 0,10%, 0,5% y 1% de α -tocoferol para un tiempo de reacción de 4 min. y los resultados se expresan como porcentaje de inhibición del radical DPPH^{•+} (Fig. 12). El α -tocoferol presenta una elevada actividad antioxidante para todas las soluciones ensayadas, siendo mayor cuanto más concentrada es la muestra hasta un límite del 0,1% a partir del cual un aumento de concentración no supone un aumento significativo de actividad antioxidante. El estudio realizado por Martins, Cerqueira, y Vicente (2012) donde se realizaron películas de quitosano con 0,1% y 0,2% de α -tocoferol resultó no tener diferencias significativas en la variación de actividad antioxidante obteniendo valores de 97,7% de porcentaje de inhibición. En el presente estudio, las 3 concentraciones más altas (1-0,5-0,1%) de α -tocoferol presentaron el mismo porcentaje de inhibición, entorno al 95%. La solución al 0,05% presentó un porcentaje de inhibición entorno al 75% y cuando se disminuyó la concentración de α -tocoferol al 0,01% resultó inferior al 20%.

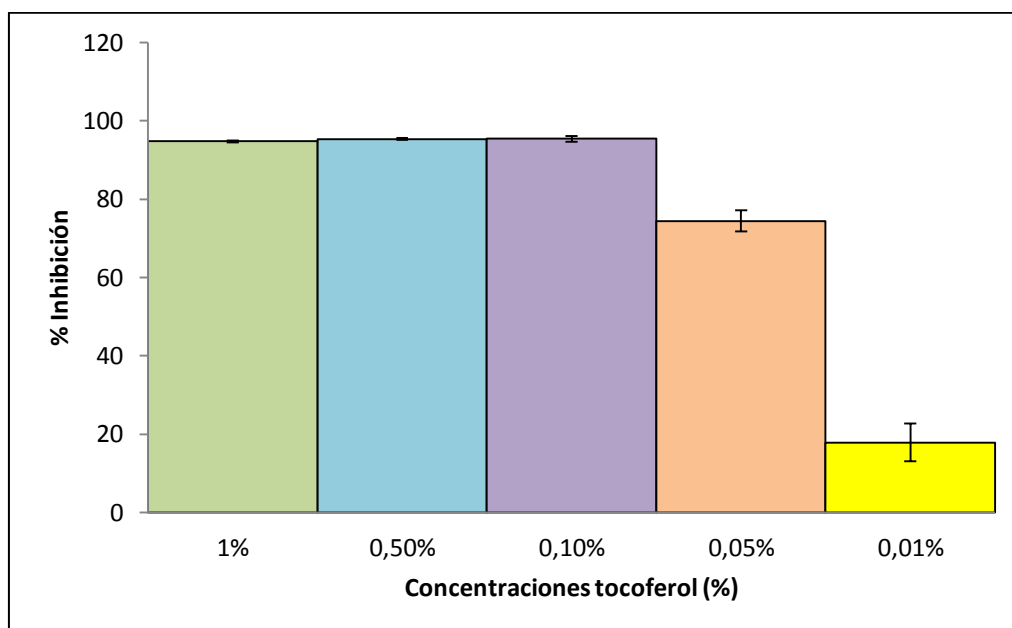


Fig. 12: Porcentaje de inhibición de diferentes concentraciones de α -tocoferol en soluciones alcohólicas.

Para evaluar el efecto que la exposición a diferentes condiciones de tiempo-temperatura puede ejercer sobre la actividad antioxidante del α -tocoferol se fijó una concentración de 350 ppm de α -tocoferol en etanol y se expuso a 3 tratamientos térmicos durante 60 min.

La concentración de α -tocoferol en las 3 soluciones se mantiene constante independientemente del tratamiento térmico aplicado ($p < 0,05$) por lo que se puede decir que para una concentración de 350 ppm en etanol, el α -tocoferol es estable durante 1 h (Fig. 13 A).

La actividad antioxidante (Fig. 13 B) sí se vio significativamente afectada por el tratamiento térmico a 70 y 90 °C, disminuyendo el porcentaje de inhibición del radical DPPH del 58% al 45% y 51% respectivamente. Este hecho puede ser debido a una reacción del radical peróxido de la molécula de α -tocoferol para formar hidroperóxidos y un radical α -tocoferilo, y como en otros radicales fenólicos, éste es relativamente no reactivo. Fennema (1996) describe la disminución de la actividad antioxidante en las diferentes formas de α -tocoferil acetato desde el 100% de la actividad para el α -tocoferol hasta la disminución de la actividad a 21% dependiendo del grado de oxidación. Las muestras de α -tocoferol en diluciones etanólicas sometidas a temperaturas de 70 y 90 °C puede que hayan reaccionado parcialmente y como consecuencia disminuir la actividad antioxidante a pesar de que el espectrofotómetro no detecte ningún cambio en la molécula de α -tocoferol. Para confirmar esta teoría se requiere un análisis de la molécula de α -tocoferol mediante HPLC-MS durante el tratamiento térmico y así comprobar si se dan diferentes formas de ésta molécula.

Por otra parte, se confirma que a pesar de ser una molécula sensible al calor (Liang, Leung Sok Line, Remondetto, y Subirade, 2010), (Graciano Verdugo, Peralta, González-Ríos y Soto-Valdez, 2005), es posible aplicar un ligero tratamiento térmico para el desarrollo de emulsiones que requieran calentamiento de la fase dispersante para su estabilización. Así, se confirma la posibilidad de emplear α -tocoferol en el desarrollo de emulsiones que incorporan WPI como macromolécula anfifílica capaces además de formar películas comestibles portadoras de agentes activos como antioxidantes, puesto que en su desarrollo es necesario en primer lugar desnaturalizar térmicamente la WPI a través del calentamiento de la solución a 90 °C durante 30 minutos. Para formar posteriormente las películas comestibles se realiza un proceso de casting que puede ahora acelerarse aplicando temperaturas a partir de 40 °C sin riesgo de afectar a la actividad antioxidante del α -tocoferol que se incorpora.

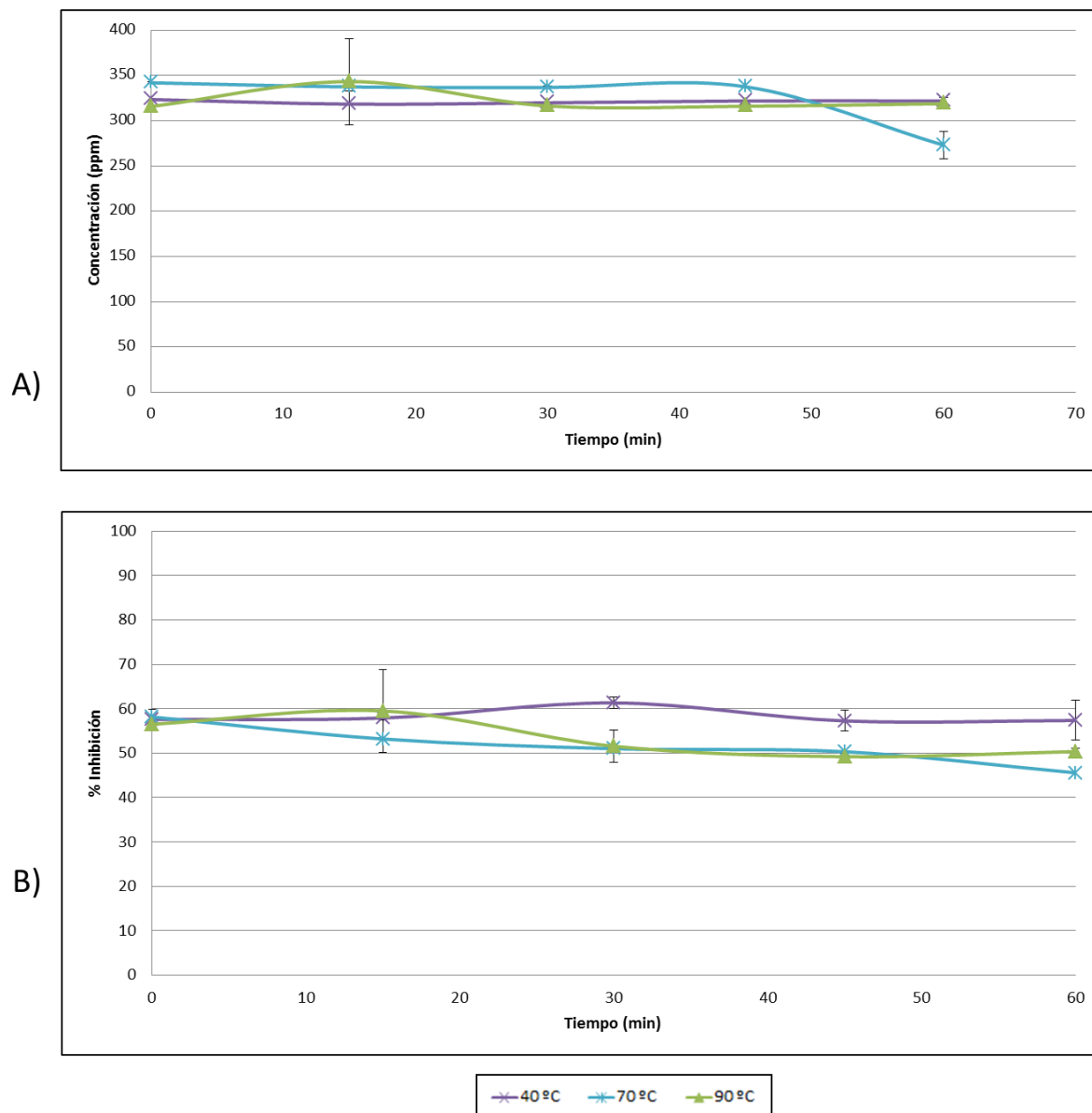


Fig. 13: Exposición de una solución etanólica de 350 ppm de α -tocoferol a 40-70 y 90 °C durante 60 min. A) Concentración de α -tocoferol, B) porcentaje de inhibición del radical DPPH.

4.2. Desarrollo y caracterización de películas comestibles basadas en WPI con α -tocoferol

Soluciones formadoras de películas (SFP) comestibles

Tras la caracterización inicial de estabilidad para las emulsiones basadas en agua y α -tocoferol (0,5 y 1%) que incorporaban WPI (10%) como macromolécula anfifílica capaz de estabilizarlas, se realizó una caracterización físico-química completa (Tabla 3) para desarrollar a partir de las mismas películas comestibles portadoras de α -tocoferol como agente antioxidante. En todo caso se empleó como control las SFP basadas en WPI sin adición de α -tocoferol.

La adición de α -tocoferol no afectó significativamente ni al pH ni a la densidad de las mismas pero sí a la tensión superficial de forma que su valor disminuyó de 51 a 35 mN/m (Tabla 3). La disminución de la tensión superficial era un efecto esperable dado que el α -tocoferol se presenta en forma oleosa y se añade a una solución acuosa (Martins, Cerqueira, y Vicente, 2012).

Tabla 3: Caracterización de las soluciones formadoras de películas

	Control	0,5% tocoferol	1% tocoferol
pH	6,96 \pm 0,01 ^a	6,94 \pm 0,02 ^a	6,95 \pm 0,01 ^a
Densidad (kg/m ³)	1036 \pm 0,00 ^a	1038 \pm 0,00 ^a	1037,5 \pm 0,00 ^a
Tensión superficial (mN/m)	51,03 \pm 0,51 ^a	35,30 \pm 0,62 ^b	34,87 \pm 0,58 ^b
Tamaño de partícula (um)	---	0.203	0.351
Potencial-z (mV)	---	-51.8	-50.9
Actividad antioxidante (%)	6,21 \pm 0,10	64,22 \pm 1,26	64,73 \pm 0,55

Se puede decir que las SFP que contenían α -tocoferol resultaron estables puesto que presentaron un valor de ζ -potencial muy alejado de la zona de inestabilidad (-30 mV). El tamaño de partícula, entorno a las 0,2 y 0,3 micras resultó mayor para las emulsiones de mayor concentración en α -tocoferol probablemente debido a la homogeneización mecánica de la emulsión. Ambas SFP presentaron una fuerte actividad antioxidante, obteniéndose valores de porcentaje de inhibición del radical DPPH entorno al 65%.

Dada la inestabilidad del α -tocoferol se calcularon las pérdidas de actividad antioxidante tras la homogeneización de las FFS y se detectó una disminución del porcentaje de inhibición del radical DPPH del 32% (disminución desde 98% hasta 64%) tanto en películas de concentración inicial de α -tocoferol de 1 como de 0,5%. Estudios como el de Manzanarez-López, Soto-Valdez, Auras, y Peralta (2011) discutieron también una disminución en el porcentaje de inhibición del 15,67%.

Películas comestibles antioxidantes: caracterización tecnológica, microestructura y actividad antioxidante

Tras el proceso de casting se obtuvieron películas comestibles basadas en WPI que incorporaban α -tocoferol como agente antioxidante. Como controles se emplearon en todo caso películas comestibles basadas únicamente en WPI. Todas las películas resultaron uniformes, homogéneas, continuas, flexibles, y no presentaron poros ni agujeros o fracturas. En todos los casos las películas se despegaron con facilidad de las placas de vidrio.

Tabla 4. Espesor, humedad y color de las películas comestibles desarrolladas.

		Control	0,5 % tocoferol	1% tocoferol
Espesor (μm)		$100 \pm 0,00^a$	$120 \pm 1,00^b$	$110 \pm 1,00^a$
Humedad (%)		$28,18 \pm 0,64^a$	$29,86 \pm 1,07^b$	$29,27 \pm 1,22^b$
Color	L*	$97,97 \pm 0,31^a$	$97,72 \pm 0,13^a$	$96,19 \pm 0,74^b$
	a*	$(-0,65) \pm 0,12^a$	$(-0,48) \pm 0,01^b$	$(-0,70) \pm 0,04^a$
	b*	$4,04 \pm 0,98^a$	$3,13 \pm 0,12^b$	$5,42 \pm 0,58^c$

Se obtuvieron películas de entre 100 y 120 μm de espesor con una humedad del 29%. En la Tabla 4 se presentan los valores de espesor, porcentaje de humedad y color de las películas desarrolladas. La medida del espesor varía significativamente dependiendo de la formulación de las películas a tratar, donde la concentración control (sin α -tocoferol) tiene su espesor el más bajo. De acuerdo con el artículo de Martins, Cerqueira, & Vicente (2012) a mayor concentración de α -tocoferol en las películas, mayor espesor.

Además, la película control es la que menor porcentaje de humedad posee en comparación con las muestras que contienen α -tocoferol en su formulación, puesto que aunque el α -tocoferol tenga carácter hidrófobo el incremento en la concentración de α -tocoferol en las películas resultó afectar en el aumento de la humedad en discordia con los resultados obtenidos por Martins, Cerqueira, y Vicente (2012) películas compuestas con quitosano.

Tomando como referencia de luminosidad $L^*=100$ el film con un 1% de α -tocoferol muestra diferencias significativas respecto al espesor del resto de formulaciones y se observa que conforme aumenta el contenido en α -tocoferol la luminosidad disminuye en un máximo de 3

unidades. En cuanto a las coordenadas cromáticas, coincidiendo con Manzanarez-López, Soto-Valdez, Auras, y Peralta (2011), se observa una ganancia significativa ($p < 0,05$) en tonos amarillos, en este se comprende una diferencia entre 3 y 5,5 unidades.

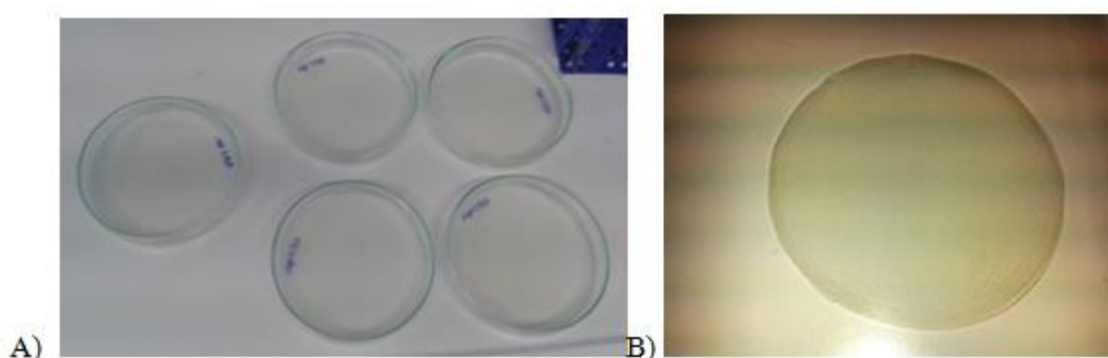


Fig. 14: Películas de α -tocoferol A) Películas en placas Petri. B) Película comestible despegada.

En la Fig. 15 se muestra la microestructura de las películas a través de las imágenes obtenidas de sus secciones transversales por microscopio electrónico de barrido. En el caso de la película control se observa una matriz continua mientras que en las películas que contienen tocoferol se puede observar la distribución del mismo interrumpiendo la matriz de WPI. La muestra con concentración de 0,5% tiene pequeñas y abundantes partículas de α -tocoferol dispersadas por todo el film al igual que la imagen de la película con concentración 1%, a diferencia de que las partículas poseen mayor tamaño y de mayor heterogeneidad respecto al tamaño y forma.

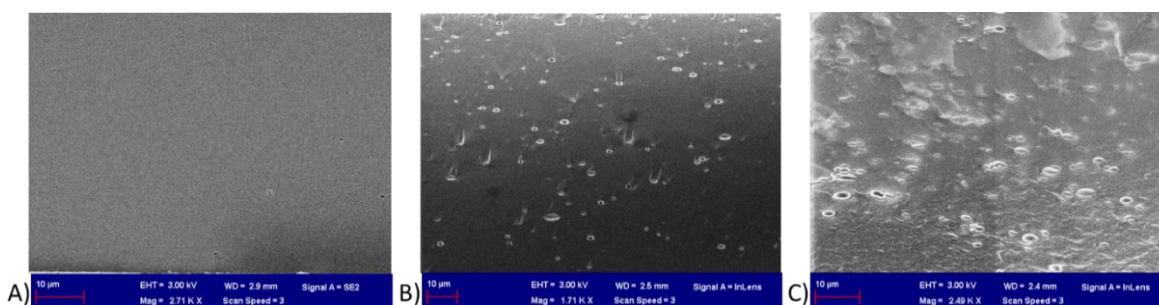


Fig. 15: Imágenes obtenidas de microscopio electrónico de barrido (MEB) de una sección transversal de diferentes concentraciones de películas comestibles. A) Película comestible control. B) Película comestible con concentración de 0,5% α -tocoferol. C) Película comestible con concentración de 1% α -tocoferol.

Análisis de la migración del α -tocoferol de las películas comestibles de WPI hacia diferentes disoluciones alcohólicas

Se quiso estudiar el efecto de la concentración de α -tocoferol en la película comestible y el efecto de la proporción de etanol en la solución alcohólica como factores determinantes en la velocidad de extracción de α -tocoferol en soluciones alcohólicas.

Se estudió la velocidad de difusión del α -tocoferol en el disolvente mediante la concentración, y también se observó la actividad antioxidante del mismo.

Se caracterizó la velocidad de liberación del α -tocoferol retenido en las películas comestibles en contacto con diferentes solventes polares. Así se estudió la velocidad de liberación del α -tocoferol hacia etanol absoluto, 50% y 10% de etanol en agua para tiempos de hasta 20 h de contacto y piezas cuadradas de 9 cm². Se limitó el tiempo de extracción a 20 h puesto que los Película comestible durante un largo período de tiempo en contacto con etanol se vuelven quebradizos y se produce una hidrólisis que puede ser de diferente grado dependiendo del tiempo en contacto con el solvente y la temperatura a la que se realice la extracción, a mayor temperatura y tiempo en contacto mayor velocidad de hidrólisis de las películas comestibles. Además en el artículo de (Manzanarez-López, Soto-Valdez, Auras, y Peralta, 2011) se destacó que la temperatura afecta más que el tiempo en exposición donde observaron de forma experimental que una muestra sometida durante más tiempo a menos temperatura (23 °C) obtuvo una degradación del polímero menor que una muestra sometida a 43 °C.

Cuando se pusieron en contacto 9 cm² de película y el solvente etanólico la concentración teórica máxima extraíble para las películas que contenían 1% α -tocoferol era de 818 ppm α -tocoferol y 409 ppm α -tocoferol para películas comestibles con 0,5% α -tocoferol.

Las películas con mayor contenido en α -tocoferol liberaron mayor cantidad de este compuesto en etanol absoluto a lo largo del tiempo (Fig. 16 A). El ratio C/C_0 para la muestra de 1% a las 2 horas de extracción es de 1, es decir, a las 2 horas se logra la total extracción del compuesto antioxidante y se mantiene su concentración hasta las 20 h. Es casi el doble en comparación con la película de concentración de 0,5% α -tocoferol, puesto que se obtiene un ratio C/C_0 de 0,683 en el mismo tiempo. En suma, la velocidad de extracción es dependiente de la concentración de α -tocoferol existente en la película, puesto que mientras que a las 2 horas de la extracción en etanol absoluto de la película de 1% se extrae todo el α -tocoferol, la muestra de 0,5% α -tocoferol a las 20 h la extracción. El gradiente de soluto es mayor en soluciones con mayor concentración al inicio de la extracción y esto deriva a que el soluto migre con mayor velocidad hacia la solución con menor proporción de soluto. Una vez que el gradiente disminuye, también lo hace la velocidad. Es por ello que se alcanza una mayor velocidad inicial de extracción en compuestos con más concentración en α -tocoferol.

Por otro lado, se estudia el efecto de la solución alcohólica en la extracción. Según los resultados obtenidos, una mayor proporción de etanol (o disminución en la proporción de agua) en la solución hace que la extracción de α -tocoferol sea mayor. Asimismo, la película de α -tocoferol en contacto con etanol absoluto obtiene mayor concentración de tocoferol extraído que la solución compuesta por 5:5 etanol:agua, seguido por 1:10 etanol en agua. Se cree que lo que

ocurre está relacionado con la hipótesis de la dispersión heterogénea en el solvente, y cuando se realiza la medida en el equipo con 3 ml de muestra pueda que se escoja muestra con muchas partículas de α -tocoferol dispersado y otras veces que no se recoja nada en ese volumen.

Ya cuando se ha obtenido la extracción total del tocoferol en solución de etanol absoluto en la segunda hora de extracción, la solución de 50% etanol ha conseguido un ratio C/C_0 de 0,34, y no es hasta las 20 horas cuando obtiene un ratio de 0,57. Reduciendo a la mitad la proporción de etanol de la solución se obtiene la mitad de velocidad de extracción. Cuando la proporción de etanol es 10 veces menor, el coeficiente C/C_0 resulta 0,16, es decir 10 veces menor.

Atendiendo a estas consideraciones se obtiene como resultado que el aumento en la cantidad de agua en la solución impide la extracción del compuesto activo, ya que según se evidencia en los resultados obtenidos, a mayor proporción de agua se adquiere menor extracción del α -tocoferol. Como explicación, el etanol permite disolver el α -tocoferol por la afinidad que tiene con el α -tocoferol puesto que los dos poseen carácter hidrófobo, a diferencia del agua por carácter hidrófilo (Noronha, de Carvalho, Lino, y Barreto, 2014). Así, cuanta mayor proporción exista de solución que permita disolver el compuesto activo, mayor extracción se obtendrá.

Después de haber estado durante 20 horas en contacto con el solvente con una proporción de agua, la película adquiere una textura blanda, suave y gomosa, y además su tamaño aumenta dada la absorción de agua. La solución etanol: agua 5:5 simula las características de un alimento alcohólico o acuoso y también los productos lácteos tal y como se expresa en el artículo de Blanco-Fernandez, Rial-Hermida, Alvarez-Lorenzo, y Concheiro (2013). Las películas comestibles actúan como superabsorbentes, humedeciéndose y absorbiendo la humedad del medio sobre todo al principio de la puesta en contacto de la película con el medio.

La extracción de α -tocoferol en etanol no es lineal, de hecho ocurre que observado un aparente equilibrio de extracción, la concentración de etanol vuelva a incrementarse. Este fue el caso de Manzanarez-López, Soto-Valdez, Auras, y Peralta (2011), que después de 4,4 días de observar estabilidad en la extracción la concentración de α -tocoferol incrementó hasta estabilizarse a los 11,2 días. Mascheroni, E., Guillard, V., Nalin, F., Mora, L., Piergiovanni, L. (2010) también ha discutido sobre la posibilidad de que el etanol penetre el film produciendo un incremento en la extracción.

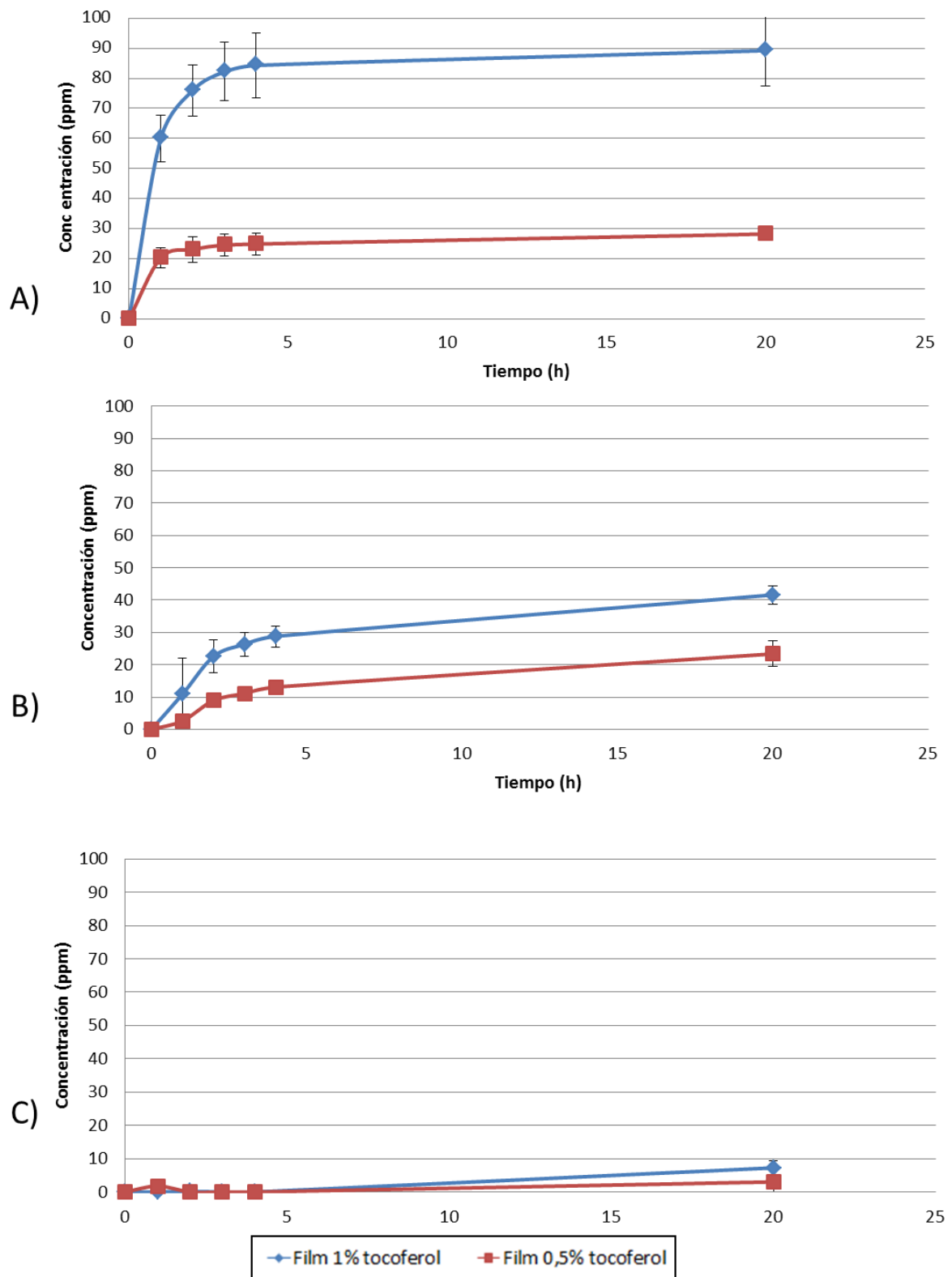


Fig. 16: Migración de α -tocoferol a soluciones etanol:agua a diferentes concentraciones durante 20 h de extracción. A) Extracción en etanol absoluto. B) Extracción en 5:5 etanol:agua. C) Extracción en 1:10 etanol:agua.

Como afirman los autores Anbinder, Peruzzo, Martino, y Amalvy (2015), la migración de un compuesto desde una película hacia un medio depende entre otras cosas, de la afinidad del soluto hacia el solvente, de la matriz en la que se encuentre, la temperatura, las características de

la película (tamaño de poro, etc.) y de las características propias del compuesto, como por ejemplo el tamaño molecular. Mediante el presente trabajo se afirma que en la extracción influye la concentración de soluto existente en las películas comestibles, el solvente utilizado y sus proporciones.

En suma, cuanto mayor proporción de α -tocoferol en las películas se obtiene mayor velocidad de extracción y una mayor proporción de agua en la solución de extracción resulto en una menor velocidad de extracción hasta llegar a la inestabilidad de las lecturas.

Para los casos de 100% y 50% etanol se alcanza mayor ($p < 0,05$) actividad antioxidante en las películas formadas con mayor concentración del compuesto activo (Fig. 17), y respecto a los solventes, la actividad antioxidante aumenta con la proporción de etanol presente en la solución de extracción. La muestra extraída con 10 % etanol no muestra significancia en la variación de concentraciones puesto que se observó una importante variabilidad de las lecturas.

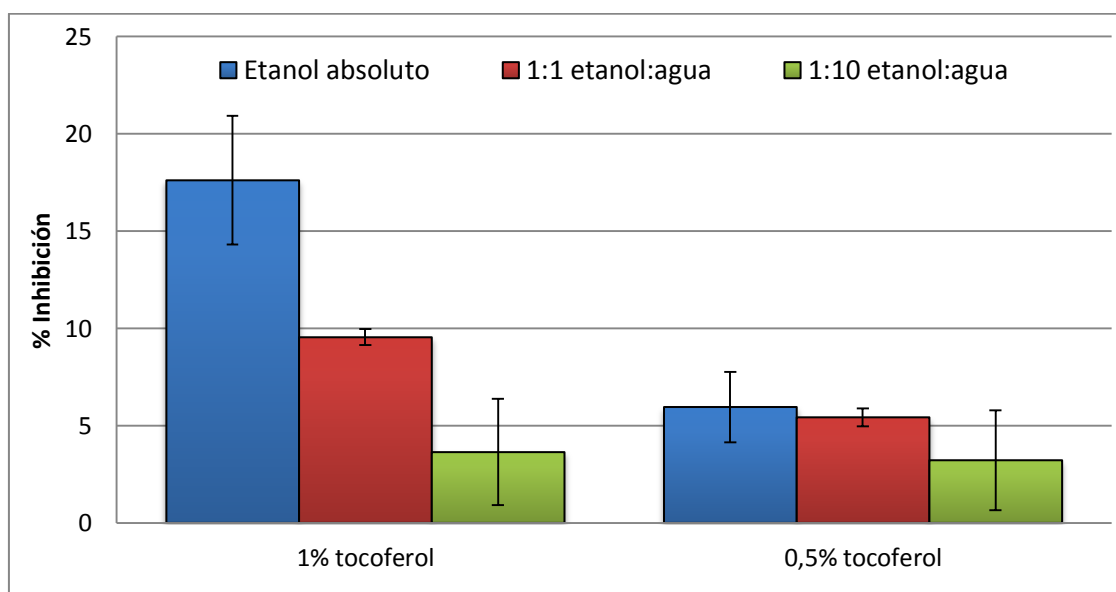


Fig. 17: Porcentaje de inhibición de α -tocoferol en soluciones etanol:agua a diferentes concentraciones a las 20 h de extracción.

En contacto con etanol absoluto las películas de 1% de α -tocoferol triplica la actividad antioxidante a las películas comestibles con la mitad de concentración. Cuando se redujo la proporción de etanol a la mitad, el ratio de porcentaje inhibición entre las películas 1% y 0,5 % α -tocoferol no llegó al doble. Con 1:10 etanol:agua se obtuvo 0,130 veces más de actividad antioxidante en el film con 1% de concentración (Fig. 17).

5. CONCLUSIONES

El presente estudio ha ayudado a entender el comportamiento del α -tocoferol tanto en diluciones alcohólicas como en soluciones formadoras de películas y películas comestibles basadas en WPI.

- El empleo de WPI en emulsiones de agua: α -tocoferol aporta una función emulsionante beneficioso para la obtención de emulsiones estables para concentraciones de 0,5 y 1% de α -tocoferol.
- La actividad antioxidante del α -tocoferol en etanol resultó ser superior a 95% para concentraciones del 1% y superiores, y se mantiene estable para tratamientos térmicos moderados de hasta 1 h a 40 °C.
- La velocidad de liberación del antioxidante en películas comestibles de WPI es función tanto de la concentración inicial en la película como de la polaridad del solvente empleado para su extracción.

Los resultados muestran que el α -tocoferol puede ser satisfactoriamente adicionado a películas comestibles de WPI en el envase alimentario alcanzando la calidad final y alargando la vida útil de productos alimentarios.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Anam-Dong, Sungbuk-Ku, Seoul, 1999. Development of advanced edible coatings for fruits. Korea University . Trends in Food Science & Technology 10. 136-701
- Anbinder, P. S., Peruzzo, P. J., Martino, M. N., y Amalvy, J. I. (2015). Effect of antioxidant active films on the oxidation of soybean oil monitored by Fourier transform infrared spectroscopy. Journal of Food Engineering, 151, 43–50. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.11.008>
- Blanco-Fernandez, B., Rial-Hermida, M. I., Alvarez-Lorenzo, C., y Concheiro, A. (2013). Edible chitosan/acetylated monoglyceride films for prolonged release of vitamin E and antioxidant activity. Journal of Applied Polymer Science, 129(2), 626–635. <http://doi.org/10.1002/app.38766>
- Brigelius-Flohé, R., Traber, M.G., 1999. Vitamin E: function and metabolism. FASEB J. 13, 1145–1155.
- España. Real Decreto nº 142/2002, de 1 de febrero, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización. Boletín Oficial del Estado. 21 de febrero de 2002. <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2002-3366>
- España. Real Decreto 866/2008, de 23 de mayo, por el que se aprueba la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo. Boletín Oficial del Estado. 30 de mayo de 2008. <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2008-9288>
- Fabra, M. J., Hambleton, A., Talens, P., Debeaufort, F., y Chiralt, A. (2011). Effect of ferulic acid and α -tocopherol antioxidants on properties of sodium caseinate edible films. Food Hydrocolloids, 25(6), 1441–1447. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.01.012>
- Fenemma Owen R. (1996). Food Chemistry. Third edition. Fenemma.
- Galus, S., Kadzińska, J., 2015. Food applications of emulsion-based edible films and coatings. Trends Food Sci. Technol. 45, 273–283. doi:10.1016/j.tifs.2015.07.011
- Graciano Verdugo A.Z., Peralta E., González-Ríos H. Soto-Valdez y H., (2005). Determination of α -tocopherol in low-density polyethylene (LDPE) films by diffuse reflectance Fourier transform infrared (DRIFT-IR) spectroscopy compared to high performance liquid chromatography (HPLC). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Mexico.

Javier Osés Fernández, 2006. Desarrollo, caracterización y aplicaciones alimentarias de recubrimientos comestibles basados en proteína de suero de leche, almidón y goma de mezquite. 42-46.

José Miguel Otín (2013). Estudio de la difusión del carvacrol y el eugenol desde películas de proteína de suero lácteo a diferentes simulantes alimentarios..[Trabajo Fin de Máster]. Universidad Pública de Navarra.

Liang, L., Leung Sok Line, V., Remondetto, G. E., y Subirade, M. (2010). In vitro release of α -tocopherol from emulsion-loaded β -lactoglobulin gels. *International Dairy Journal*, 20(3), 176–181. <http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.09.008>

Manzanarez-López, F., Soto-Valdez, H., Auras, R., & Peralta, E. (2011). Release of α -Tocopherol from Poly(lactic acid) films, and its effect on the oxidative stability of soybean oil. *Journal of Food Engineering*, 104(4), 508–517. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.12.029>

Martins, J. T., Cerqueira, M. A., y Vicente, A. A. (2012). Influence of α -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. *Food Hydrocolloids*, 27(1), 220–227. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.06.011>

Mascheroni, E., Guillard, V., Nalin, F., Mora, L., Piergiovanni, L., 2010. Diffusivity of propolis compounds in polylactic acid polymer for the development of anti-microbial packaging films. *Journal of Food Engineering* 98

Muñoz Juárez, M.A. y Dra. Gutiérrez, D.M. (2008). Determinación de actividad antioxidante de diversas partes del árbol nicotiana glauca. Universidad Autónoma de Querétaro.

Noronha, C. M., de Carvalho, S. M., Lino, R. C., y Barreto, P. L. M. (2014). Characterization of antioxidant methylcellulose film incorporated with α -tocopherol nanocapsules. *Food Chemistry*, 159, 529–535. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.159>

Olivas Orozco G. I., González-Aguilar G. A., Martín Belloso O., Soliva-Fortuny R. (2012). Películas y recubrimientos comestibles. Propiedades y aplicaciones en alimentos. Universidad de Lleida. Editorial Clave.

Opawale, F.O., Burgess, D.J., 1998. Influence of Interfacial Properties of Lipophilic Surfactants on Water-in-Oil Emulsion Stability. *J. Colloid Interface Sci.* 197, 142–150. doi:10.1006/jcis.1997.5222

Philip Molyneux (2003). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity Songklanakarin J. Sci. Technol., 2004, 26(2) : 211-219.

Regina Brigelius-Flohe y Maret G. Traber, 1999. Vitamin E: Function and metabolism. German Institute of Human Nutrition, Bergholz-Rehbrücke, Germany; and †Department of Nutrition and Food Management, Linus Pauling Institute, Oregon State University, Corvallis, Oregon 97330, USA.

Skurtys¹ O., Acevedo¹ C., Pedreschi² F., Enrione¹ J., Osorio¹ F., Aguilera² J. M., 2010. Food Hydrocolloid Edible Films and Coatings. Universidad de Santiago de Chile and Pontificia Universidad Católica de Chile. 1-9.

Tovar del Río, Jennifer (2013). Determinación de la actividad antioxidante por dpph y abts de 30 plantas recolectadas en la ecoregión cafetera. [Trabajo de Grado] Universidad tecnológica de pereira.

W. Brand Williams, M. E. Cuvelier y C. Berset (1994). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, Département Science de l'Aliment